

Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica y receptores de somatostatina en hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental

Carmen Sobrino*, Aranzazu Peinares, Lilian Puebla Jiménez, Eduardo Arilla Ferreiro

Departamento de Biología de Sistemas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es la causa principal de discapacidad neurológica en adultos jóvenes. La encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante (EAE-CR) es un modelo animal de la EM. En dichas enfermedades existen infiltrados inflamatorios que contienen linfocitos T, macrófagos y un alto grado de estrés oxidativo en sustancia gris y blanca del sistema nervioso central (SNC). La proteína quinasa θ (PKC θ) se encuentra únicamente en linfocitos T. Se ha descrito que ratones genéticamente deficientes en PKC θ , son resistentes a la inducción de EAE-CR. Por lo tanto la PKC θ es una atractiva diana terapéutica para esta enfermedad. La EAE-CR se indujo en ratas Lewis hembra de 5 semanas de edad mediante inmunización con un homogenado de médula espinal de cobaya. Un grupo de ratas, fue tratado con el inhibidor de PKC α ciclosporina (0,4 mg/Kg), administrado mediante sonda gástrica. Un segundo grupo fue tratado con el inhibidor de PKC θ queleritrina (5 mg/Kg) por vía subcutánea. Ambos tratamientos se iniciaron dos días antes de la inmunización y se continuó mediante administración de dichos inhibidores de PKC, cada dos días hasta el momento del sacrificio. Las ratas se sacrificaron en el primer brote de la enfermedad mediante exanguinación por punción cardíaca y posteriormente se aisló el hipocampo. Las ratas con EAE-CR en grado 3 mostraron un aumento significativo de la peroxidación lipídica en el hipocampo y una disminución significativa de los niveles proteicos del receptor 3 de somatostatina (SSTR3). La administración de queleritrina y ciclosporina revirtieron parcialmente las alteraciones observadas en la EAE-CR. Estos resultados sugieren que la queleritrina puede ser beneficiosa en reducir la peroxidación lipídica y alteraciones secundarias a ella en la EAE-CR.

Palabras clave: esclerosis múltiple, encefalomiелitis aguda experimental crónica recidivante, receptor de somatostatina, inhibidores de PKC.

Cita: Sobrino C, Peinares A, Puebla L, Arilla E (2013) Efecto de la queleritrina y la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica y receptores de somatostatina en hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental. *Dianas* 2(2): e20130906. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130906
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 25 de junio de 2013

Copyright: © 2013 Sobrino et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** csobri@yahoo.es



Introducción

Esclerosis múltiple y encefalomiелitis autoinmune experimental.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad neuroinflamatoria crónica desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC) y representa la causa no traumática más frecuente de invalidez en el adulto joven. La prevalencia de la EM en España es de 60 a 70 casos por cada 100.000 habitantes, aunque estudios recientes parecen indicar que la incidencia está aumentando. La distribución epidemiológica de la EM es muy llamativa presentando un gradiente Norte-Sur. Tanto la prevalencia como la incidencia de la enfermedad son mayores según nos alejamos del ecuador y mayor en el hemisferio norte.

El neurólogo francés Jean-Martin Charcot, fue el primero en dar una descripción detallada de la EM a la que llamó “esclerosis en placas”. La tríada de Charcot vinculada con el diagnóstico de la esclerosis múltiple incluye la combinación de tres signos comúnmente encontrados en esta enfermedad, aunque no son patognomónicos de ella: temblor intencional, nistagmo y lenguaje escandido.

La etiología de la EM no está todavía claramente establecida aunque diversos estudios apuntan a que puede haber factores genéticos, víricos y ambientales que pueden aumentar la susceptibilidad de padecer la enfermedad.

Las características clínicas de la enfermedad son muy variables puesto que dependen de la localización de las lesiones desmielinizantes. El síntoma de comienzo más frecuente es la alteración de la sensibilidad (hasta un 40% de los pacientes). Otros signos frecuentes de la enfermedad son debilidad, disfunción vesical, diplopía, alteraciones de la visión, alteraciones emocionales y déficit cognitivo. La edad de comienzo suele ser 25-35 años y es más frecuente en mujeres que en hombres.

Actualmente están tipificadas cinco formas de evolución de la enfermedad:

1. Forma recurrente recidivante (RR): es la más frecuente, apareciendo en un 83-90% de los casos. Se trata de episodios o brotes de disfunción neurológica más o menos reversibles que se repiten a lo largo del tiempo y van dejando secuelas más o menos reversibles.
2. Forma secundaria progresiva (PS): algunos autores piensan que aproximadamente el 50% de las formas RR tras un periodo de 10 años, empiezan a tener mayor número de brotes y secuelas.
3. Forma primaria progresiva (PP): sólo un 10% de los pacientes presentan esta forma que se inicia con brotes invalidantes, sin que responda al tratamiento.
4. Forma progresiva recurrente (PR): exacerbaciones o agravamientos ocasionales tras un curso progresivo.
5. Forma benigna (FB): es la forma de EM que permite al paciente preservar su capacidad funcional en todo el sistema neurológico, 10-15 años después de la presentación de la enfermedad. En algunos casos puede derivar a la forma PS.

Desde el punto de vista anatómico las lesiones se localizan con mayor frecuencia en la sustancia blanca periventricular y subpial del cerebro, cerebelo y médula espinal. En las lesiones agudas el fenómeno patológico predominante es la inflamación, mientras que en las crónicas lo que destaca es la desmielinización, que progresivamente se acompaña de degeneración axonal y gliosis. En estas lesiones encontramos fundamentalmente linfocitos y macrófagos, dentro de éstos últimos se pueden identificar los productos de degradación de la mielina.

La encefalomiелitis autoinmune experimental cónica recidivante presenta disfunciones neurológicas e inmunológicas similares a la EM sirviendo como modelo de esta enfermedad. En este modelo, animales genéticamente susceptibles son inmunizados utilizando médula espinal de cobaya. La EM y la EAE-CR comparten la infiltración en el SNC por células T autoreactivas y macrófagos así como desmielinización, con distintos grados de daño axonal y neuronal.

La etiopatogenia de la EM no está todavía claramente establecida. No obstante, hay evidencias que sugieren que la disregulación del sistema inmune es clave en los procesos neurodegenerativos. Estudios en esta dirección apuntan que en el proceso patológico intervienen linfocitos T autoreactivos, células B y células glias que organizarían un ataque humoral y celular contra el SNC, tanto frente a la mielina como frente a los cuerpos neuronales de la sustancia gris.

Hay evidencias inequívocas de que la EAE se inicia por una activación de las células T, concretamente las Th1 [1] aunque como veremos más adelante las células B también participan en la patogénesis de la EAE. Así mismo la progresión de la enfermedad está también conducida por linfocitos T CD4 efectoras [2].

Existen dos posibles vías de activación de los linfocitos: que los antígenos sean fagocitados en el CNS por las células presentadoras de antígeno (APC) y que éstas los transporten a los nódulos linfáticos (LN), donde los presentan a los linfocitos, o que los antígenos sean transportados pasivamente por la linfa a los LN donde serían fagocitados por las APC y presentados a los linfocitos.

En los brotes de la enfermedad, las células Th 1 específicas de antígeno, tras activarse, atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB). Este es un proceso de localización y trans migración mediado por moléculas de adhesión celular (CAM) expresadas recíprocamente por el endotelio de la BBB y las células Th 1, entre las que se encuentran la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM1) y glicoproteína ligando P-selectina-1 (PSGL-1).

Las células Th1 provocan daño axonal mediado por las células TCD4⁺ y TCD8⁺. Las células TCD4⁺ segregan interferon-gamma (INF-γ), el cual induce reclutamiento de macrófagos y un aumento de MHC II sobre la superficie de éstos, facilitando así la activación de células Th1. Las células TCD4⁺ también activan a la microglía, la cual produce el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) y óxido nítrico (NO), induciendo un daño directo sobre oligodendrocitos. La microglía activada interacciona con los astrocitos mediante la secreción de citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF-α, regulando así la expresión de distintas CAM (ICAM-1 y E-selectinas) en astrocitos y provocando una astrogliosis. La microglía también tiene la capacidad de segregar diferentes serina proteasas y metaloproteasas de la matriz (MMP) (MMP2 y MMP9) que son capaces de degradar la proteína básica de mielina (MBP), contribuyendo así a la respuesta inmune mediada por dicha proteína dentro del CNS y a la desmielinización. Estudios recientes

han demostrado que la IL-23, IL-6 y el TGF- β provocan la diferenciación de un subtipo de célula T, la TCD4⁺ a la célula Th 17, que segrega IL-17 [3].

Las células TCD8⁺ migran desde los LN cervicales y lumbares, tras activarse al reconocer MHC I, al CNS. Una vez en el CNS, experimentan expansión clonal por la interacción con distintas moléculas y ejercen una actividad citotóxica directa sobre los oligodendrocitos y neuronas que expresan MHC I.

A pesar de evidencias inequívocas de que la EAE se inicia mediante células T, también hay evidencias de un papel de las células B (células plasmáticas) y sus productos en la patogénesis de la EAE que pueden estar involucradas en los fenotipos de la enfermedad así como en su gravedad. La respuesta mediada por las células B comienza en los LN tras el reconocimiento del Ag por parte de sus receptores B (BCR). Las células B activadas son capaces de atravesar la BBB. El papel de las células B en la patogenia de la enfermedad no solo se debe a la producción de anticuerpos contra la proteína básica de mielina sino a su capacidad de producir citoquinas proinflamatorias, a la presentación de antígenos a células T, y a la activación de células T reguladoras (Tregs).

Estudios recientes han mostrado que la MS se acompaña de una disfunción de la maduración y de la función de las células Tregs [4]. Dichas células en los LN interaccionan con las APC y las regulan, modulan la interacción de las APC y las células asesinas naturales (NK), controlan la maduración y el número de las NK ejercen una supresión directa de los monocitos y de los macrófagos e inducen apoptosis de las células B mediante grancimas y perforinas [5].

Estudios relacionados con enfermedades autoinmunes han puesto en evidencia que existe una alteración de la actividad de las células NK en estas patologías. Se ha demostrado que las células NK son supresoras de la diferenciación de las células B y de la síntesis de anticuerpos, por lo que se postula que alteraciones en el número o en la función de estas células podrían conllevar una activación de las células B y la consiguiente producción de anticuerpos. En estudios sobre la EAE, se ha observado que células NK ejercen un efecto citotóxico directo sobre las células T encefalolíticas específicas de autoantígeno. No obstante, otros autores han demostrado un aumento de células NK reactivas contra la proteína básica de mielina en pacientes con MS [6] por lo que aún no está claro el verdadero papel que juegan las células NK en la patogenia de esta enfermedad.

Estudios recientes sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la EAE al igual que en la MS y contribuye directamente al daño del CNS. Se ha demostrado que células del CNS, especialmente oligodendrocitos y neuronas, son muy vulnerables al daño oxidativo. Está bien establecido que la inflamación produce un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que da lugar al estrés oxidativo. Una de las fuentes más abundantes de ROS, además de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, es el “estallido respiratorio” de la microglía activa. Este sistema opera de una forma intermitente: cuando está activado, en la membrana externa de la microglía se generan una gran cantidad de ROS, sobre todo ión superóxido, lo que hace que aumente la concentración del mismo en el espacio circundante. Todo parece indicar que los radicales libres de oxígeno y nitrógeno son un factor importante en la patogénesis de la EAE y de la MS. Los radicales libres de oxígeno y nitrógeno producidos por los macrófagos están implicados en la desmielinización y daño axonal tanto de la MS como de la EAE. Su consecuencia, el daño oxidativo a lípidos de membrana, proteínas y DNA, se ha demostrado en lesiones de MS y EAE. Además estos radicales pueden activar ciertos factores de transcripción (NF- κ B) que activan la expresión de genes implicados en la EAE y la MS, como TNF- α , iNOS, VCAM-1 e ICAM-1. También estas reacciones redox están implicadas en la actividad de las metaloproteasas de la matriz (MMP) que juegan un importante papel en el tráfico de los linfocitos T. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar cómo un aumento de los niveles de ROS puede mediar en el daño a nivel del CNS que sufren los pacientes con MS. Uno de ellos es que los bajos niveles de antioxidantes producen una activación de la lipooxigenasa que deriva en la producción de leucotrienos que potencia el proceso inmuno-inflamatorio en el tejido cerebral. Otros han postulado que ROS puede potenciar la activación de los linfocitos T a través de la cascada del ácido araquidónico, o producir un daño directo a nivel de la BHE [7].

Asimismo, nuestro grupo de investigación (gracias al proyecto concedido por el Ministerio) ha demostrado un déficit de la actividad del sistema receptor-efector de la somatostatina (SST) en el estriado e hipocampo de ratas con EAE aguda [8]. En ratas con EAE, se ha descrito un déficit cognitivo asociado a una disminución en la actividad de la colina acetiltransferasa y en los niveles del RNAm del factor de crecimiento neural (NGF) en corteza cerebral e hipocampo. Dada la implicación de la SST en funciones cognitivas y motoras, la disminución del sistema receptor-efector de la SST en la EAE sugiere la implicación adicional de dicho sistema en el déficit cognitivo y alteraciones motoras descritas en dicha patología.

Somatostatina:

Es un tetradecapeptido también denominado factor inhibidor de la secreción de somatotropina (SRIF). Existen dos formas biológicamente activas SRIF-14 y la SRIF-28. La SRIF-14 es un péptido de estructura cíclica que posee 14 aminoácidos estabilizados mediante puente disulfuro.

La expresión y secreción de la SRIF están reguladas por diferentes factores, entre ellos, nutrientes, neurotransmisores y neuropéptidos. Así, agonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato (en corteza), la GH (en hipotálamo), glucocorticoides (en hipotálamo y corteza), la IL-1 y el TNF (en cultivos de diencefalo) aumentan tanto la secreción de la SRIF como la expresión del gen de dicho péptido.

El AMPc regula la expresión del gen de la SRIF a través del CRE, al que se une la proteína de unión a CRE (CREB). La eficacia transcripcional se regula por fosforilación de dicha proteína mediante la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) [9].

En cerebro la SRIF desempeña funciones cognitivas, locomotoras y sensoriales. En la última década, se ha demostrado que la SRIF también posee propiedades inmunoreguladoras. En monocitos circulantes o macrófagos periféricos, la SRIF inhibe la síntesis del ARNm del TNF- α , estimulada por el propio TNF- α , y la expresión de sus receptores. La SRIF también inhibe la proliferación de la microglia en condiciones tanto basales como estimuladas. En microglia, la SRIF inhibe la fosforilación de proteínas estimuladas por el factor estimulador de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF) [10]. En astrocitos de corteza cerebral de rata, la SRIF inhibe la secreción de IL-6 a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (AC).

Los cinco subtipos de receptores de SRIF pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y se denominan sst1-5. En el cerebro de la rata, los ARNm de los subtipos sst1-4 se han localizado, mediante hibridación *in situ*, en corteza, estriado, hipotálamo, amígdala e hipocampo. El sst1 es el más abundante a lo largo del eje neural, el sst2 es el más abundante en corteza, mientras que el receptor sst5 es especialmente abundante en hipotálamo e hipófisis, con niveles muy bajos en otras áreas cerebrales. Los mayores niveles de ARNm de sst3 se detectan en el cerebelo, especialmente en la capa granular y su distribución es homogénea en el resto del SNC.

Está bien establecido que la fosforilación desempeña un papel muy importante en la regulación de los sst. Se ha demostrado que una vez que los receptores se han activado, debido a la unión de su agonista, éstos se desensibilizan mediante fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en el dominio carboxilo-terminal intracelular del receptor, provocando un desacoplamiento entre el sst y la proteína G. Dicha fosforilación está catalizada por miembros de la familia de quinasas de GPCRs (GRKs) [11], de la que actualmente se conocen siete miembros denominados GRK1-GRK7. Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha demostrado que las isoformas GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 son las que se expresan mayoritariamente en cerebro de rata [12]. Por lo tanto, la fosforilación del receptor y el posterior reclutamiento de proteínas citosólicas denominadas arrestinas producen el desacoplamiento entre el receptor y la proteínas G, y la consiguiente internación y posterior degradación del receptor. Todos los sst, excepto el sst4, se desensibilizan mediante el mecanismo descrito anteriormente. El sst4 posee una alanina en lugar de una treonina en la posición 331 en el extremo carboxilo-terminal. Se ha observado que el subtipo sst4 de rata transfectado en células de riñón humano, después de su activación por el agonista, posee una cierta resistencia a la desensibilización e internalización.

Inhibidores de PKC

La proteína quinasa C (PKC) θ y, probablemente, la PKC- α son cruciales en la activación de la célula T a través del TCR, al ponerse en contacto éste con su antígeno, el cual ha sido presentado por la APC. Asimismo, la calcineurina juega un papel importante en dicha activación. Experimentos en ratones genéticamente deficientes en PKC- θ revelan defectos en las vías de transducción de señales del TCR para la proteína activadora-1 (AP-1) y en la transactivación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y posterior liberación de IL-2; así como en la expresión de CD25 y CD69 [13]. Además, la PKC- θ actúa como una molécula clave en la supervivencia de las células T. Dicha quinasa, a diferencia de la mayoría de las PKC, tiene una expresión restringida, encontrándose únicamente en células T [14-15]. En líneas celulares, la transducción de señales mediada por PKC- θ produce la activación de dos factores de transcripción, el AP-1 y NF- κ B, en respuesta a la coestimulación TCR/CD28, culminando con la inducción de genes que son esenciales para la proliferación y función de las células T activadas [16]. Se ha descrito que ratones genéticamente deficientes en PKC- θ son resistentes a la inducción de la EAE [17]. Estos resultados sugieren, por tanto, que la PKC- θ juega un papel esencial en el desarrollo de la respuesta inmune mediada por las células Th1, así como en la producción de la citoquina proinflamatoria/patogénica IL-17 *in vivo*. La expresión selectiva de PKC- θ y su papel esencial en la activación de las células T maduras la convierte, pues, en una atractiva diana terapéutica.

Objetivos e hipótesis de trabajo

Hay evidencias que sugieren que la SST podría estar implicada en la EM y en la EAE-CR, dos procesos neuroinflamatorios en los que el estrés oxidativo parece jugar un papel importante. Tanto la EM como la

EAE-CR cursan con trastornos en el aprendizaje y la memoria, procesos vinculados con el hipocampo. El hipocampo es un área cerebral rica en somatostatina y se sabe que ésta facilita procesos cognitivos. Estudios recientes *in vitro* nos han llevado a considerar como hipótesis de partida que la inhibición de la PKC- α , y PKC- θ y de la calcineurina, presentes en los linfocitos T, podría bloquear el desarrollo de la EM al impedir la activación de dichos linfocitos. Por ello, consideramos pertinente investigar el posible papel preventivo y/o terapéutico del: cloruro de queleritrina (PIK-90) (LC Laboratories), como inhibidor de la PKC- θ , y de la ciclosporina A, Saumminum NEORAL[®] (Novartis Pharmaceuticals Corporation) como inhibidor de la PKC- α , en un modelo experimental de EM como es la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica-recidivante (EAE-CR). Para evaluar esta hipótesis nos propusimos analizar los siguientes objetivos:

- 1) Analizar los efectos de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la modulación en la expresión del receptor de la SST en el hipocampo.
- 2) Evaluar el efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica en el hipocampo,

Métodos

Animales de experimentación

Los animales que se utilizaron en el presente proyecto fueron ratas Lewis (consanguíneas) hembras con seis semanas de edad al comienzo del estudio. Los animales se dividieron en seis grupos experimentales: ratas control (C), ratas con EAE-CR (E), ratas con EAE-CR tratadas con cloruro de queleritrina (ETQ), ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina (ETC), y sus respectivos controles tratados (CTQ y CTC). Las ratas EAE-CR, ETQ y ETC, se inmunizaron como se explica en el apartado siguiente. Los tratamientos se realizaron de la siguiente manera:

Cloruro de queleritrina (PIK-90) (Q): administración subcutánea. Dosis 0,4 mg/Kg

Ciclosporina A Saumminum NEORAL[®] (C): administración oral mediante canulación. Dosis 5 mg/Kg

En ambos casos, la administración del tratamiento se realizó cada dos días hasta el momento del sacrificio.

Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental crónica-recidivante (EAE-CR).

La inducción de la EAE crónica-recidivante (EAE-CR) se realiza según el modelo descrito por Feurer y col., 1985. A ratas Lewis de seis semanas de edad se les inyecta 100 μ l de una emulsión de homogenado de médula espinal de cobayo (50 mg) con adyuvante incompleto de Freund-Salino (1:1) suplementada con *Mycobacterium tuberculosis* (2 mg/ml) en cada una de las almohadillas de las patas posteriores.

Los datos aquí analizados corresponden a las ratas sacrificadas en el primer brote de la enfermedad (día 15-17 post-inducción) marcado por la primera aparición del estadio 3 en el grupo EAE-CR.

Se detectaron signos clínicos de la EAE en el 95% de las inducciones.

Extracción del encéfalo y disección del hipocampo

Extracción del encéfalo.

Una vez sacrificadas las ratas por punción cardíaca, se procedió a la decapitación con una guillotina a nivel de la primera y segunda vértebra cervical. Inmediatamente después, se procede a la extracción del encéfalo el cual se deposita sobre una placa de metal enfriada en hielo.

Disección del encéfalo.

Una vez extraído el encéfalo, se procede a la disección del hipocampo siguiendo el método de Glowinski e Iversen (1966) descrito para la obtención del hipocampo.

Preparación de las muestras biológicas.

Aislamiento de membranas y citosoles de hipocampo.

Las membranas procedentes del hipocampo de la rata se aíslan de acuerdo al método descrito por Reubi y col.(1985) Para ello una vez disecado por el método descrito por Glowinski e Iversen (1966) el hipocampo fue homogenizado en un tampón de Hepes-KOH 10mM (pH7.6) con un politrón Birkmann durante 15 segundos. Se centrifuga el homogenado a 600xg durante 10 minutos a 4°C y, posteriormente, el sobrenadante se pasa a tubos de policarbonato para ser centrifugado a 48000xg durante 30 minutos a 4°C. El precipitado resultante se resuspende en tampón Hepes-KOH 10mM y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El nuevo precipitado se resuspende en Tris- HCl 50mM (pH 7.5) y las membranas se guardan a -80°C hasta el día del ensayo. Estas alícuotas se conservan a -80°C, guardando una pequeña muestra para medir la concentración de proteínas (de membrana en este caso) por el método de Lowry y col. (1951).

Para separar el citosol, se ultracentrifuga el sobrenadante de la primera centrifugación a 150000 xg durante una hora a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se conserva a -80°C, separando de nuevo una pequeña muestra para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

Medida de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (1951).

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de *Lambert-Beer*.

Procedimiento:

Para realizar la valoración se preparan distintas disoluciones a partir de los citosoles y membranas aislados previamente. La dilución es 1/4 tanto para membrana como para citosol en agua miliQ. Posteriormente las muestras de membranas deben ser sonicadas durante 1 minuto, y 4 pulsos para las muestras de citosol, para que se disgreguen todas las proteínas de la muestra. Es fundamental que durante este paso, las proteínas se mantengan en hielo, evitando el calentamiento excesivo de la muestra, y la posible desnaturalización proteica asociada.

Tras sonicar, se debe crear una curva de valoración por duplicado en la que las cantidades de proteína estándar (albúmina de suero bovina, BSA, a concentración 1mg/ml) figuren entre 0 y 100 µg, y en la que serán extrapolados los datos, también por duplicado, de las distintas muestras.

Por último, leer la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

Inmunodeterminación de los subtipos de receptores de somatostatina, GRK y β – arrestina.

Preparación de las muestras

Se toma un volumen determinado de las muestras y se centrifuga durante 5 min a velocidad máxima (13.000.000 rpm) en una minifuga. A continuación, se aspira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en tampón de muestras de modo que la cantidad de proteínas a cargar en el gel sea de 50 µg en membranas y 8,78 µg en citosoles. Previo a la carga de las muestras en el gel, éstas se calientan a 100°C durante 5 min, con el fin de desnaturalizar las proteínas.

Electroforesis

La electroforesis se lleva a cabo a 80 V los primeros 20 minutos hasta que el frente recorre el gel concentrador (5%) y posteriormente aproximadamente 1 hora a 120 V para que recorra el gel separador (12%).

Transferencia

Las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF mediante la aplicación de un campo eléctrico de 15 V durante toda la noche en tampón de transferencia.

Inmunoblot

Las membranas de PVDF se incuban con anticuerpos policlonales anti-sst1-3, anti GRK y anti β -Arrestina a dilución 1:1000 en TTBS/ Tween al 1%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y se lavan las membranas 3 veces con TTBS durante 5 min. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000, y las membranas se incuban a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies

Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en membranas

El grado de peroxidación de lípidos se midió por el método de Ottolenghi (1959). A 100 µl de fracción citosólica se añaden 200 µl de TCA 10% frío para precipitar proteínas. Se deja reposar 20 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan a 11000xg a 4°C. Se toman 200 µl de la muestra a los que se le añade 200 µl de ATB al 0.67%. Se incuban durante 10 minutos en agua hirviendo y se deja enfriar. Posteriormente se lee a 535nm. La curva de calibrado se hace con TMOP 500 µl a concentraciones que van desde 0 a 100 µl con agua destilada.

Resultados

Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica:

Como anteriormente se ha descrito en la EM y en la EAE el estrés oxidativo parece jugar un papel importante en la patología de la enfermedad. El SNC es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a la cantidad de ácidos grasos polinsaturados que contiene. Por ello el grado de peroxidación de lípidos es indicativo del daño celular producido en la EAE.

Los resultados muestran un aumento significativo de los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (malondialdehído), un marcador clásico de peroxidación lipídica en las ratas con encefalomiелitis. El tratamiento con ciclosporina disminuyó significativamente la peroxidación lipídica con respecto a las ratas con encefalomiелitis. El tratamiento con queleritrina disminuye significativamente este grado de peroxidación respecto a las ratas control (*) así como respecto las ratas con encefalomiелitis (#).

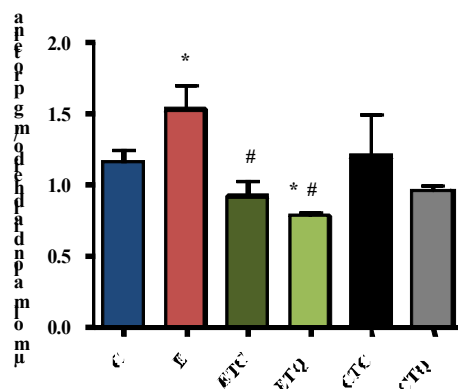


Figura 1: Concentración de malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica, en el hipocampo de la rata (n=5). Los datos se representan como μmolde malondialdehído por mg de proteína. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados. Comparación estadística frente al control: *p<0.05 Comparación estadística enfermo con enfermo tratado # p<0,05

Membrana

Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre los receptores de sstr1, sstr2 y sstr3:

Para llevar a cabo los objetivos propuesto, se realizan 6 grupos experimentales: control, enfermo, enfermo tratado con ciclosporina, enfermo tratado con queleritrina y sus correspondientes controles tratados. Se detectaron signos clínicos de EAE en el 95% de las inducciones. Los receptores sstr1, sstr2 y sstr3 están ampliamente distribuidos en el cerebro, por lo que analizamos mediante wetern blot los niveles de dichos receptores en hipocampo.

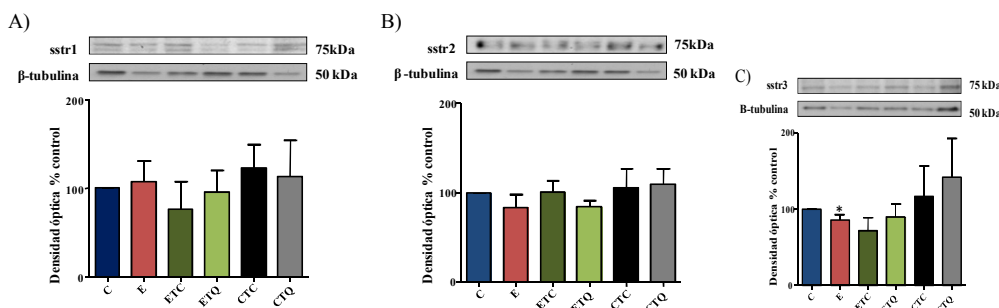


Figura 2: Efecto de la ciclosporina y de la queleritrina sobre los receptores de somatostatina sstr1 (panel A), sstr2 (panel B) y sstr3 (panel C) en membrana de hipocampo de rata. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados. El tamaño de la muestra fue N=5. Panel superior se muestran las autorradiografías procedentes de la inmunodetección de los sstr. Panel inferior: Análisis densitométrico de dichas autorradiografías. A la densidad óptica del control se le asignó un valor arbitrario de 100. La densidad óptica de los grupos experimentales se representa en porcentaje respecto al control. Los datos se representan la media \pm ESM. Comparación estadística frente al control: *p<0.05.

Los niveles de sstr3 en las ratas con encefalitis están disminuidos con respecto al control. En el caso de los controles tratados se puede apreciar una tendencia a aumentar con respecto al enfermo, si bien no ésta tendencia no es significativa. Los tratamientos tienden a recuperar los niveles proteicos de sstr3. La recuperación en el caso de los enfermos tratados con queleritrina, parece ser ligeramente mayor que con el otro tratamiento.

Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre GRK 2 y β -arrestina:

Con el fin de profundizar en el estudio de la modulación del sst en la EAE-CR, analizamos los niveles de GRK y β -arrestina en hipocampo.

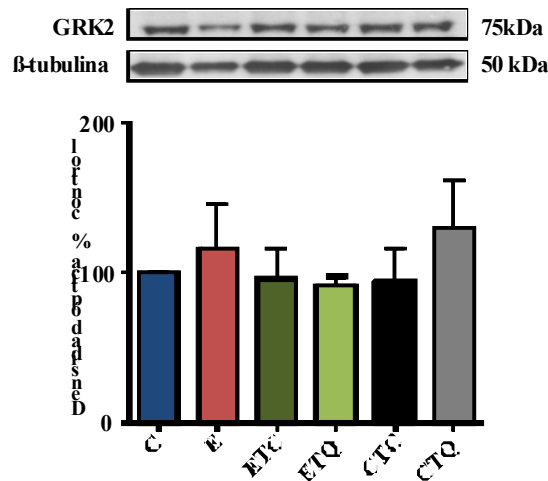


Figura 3: Efecto de la ciclosporina y de la queleritrina sobre las isoforma 2 de la proteína quinasa asociada al receptor de somatostatina GRK 2 en membrana de hipocampo. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados. El tamaño de la muestra fue N=4. Panel superior se muestran las autorradiografías procedentes de la inmunodetección de GRK 2. Panel inferior: Análisis densitométrico de dichas autorradiografías. A la densidad óptica del control se le asignó un valor arbitrario de 100. La densidad óptica de los grupos experimentales se representa en porcentaje respecto al control. Los datos se representan la media \pm ESM. Comparación estadística frente al control: * $p < 0.05$.

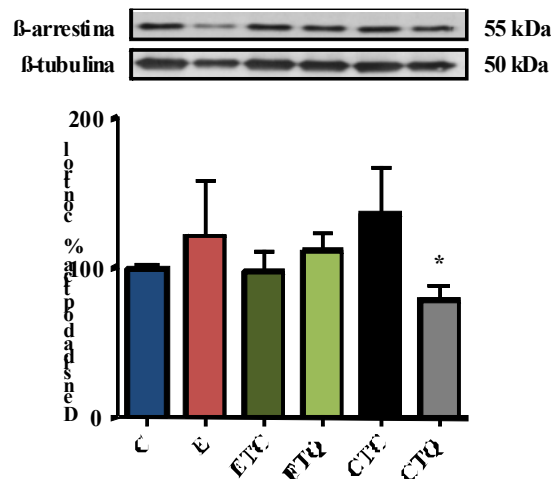


Figura 4: Efecto ciclosporina y de la queleritrina sobre las β -arrestina en membrana de hipocampo. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados. El tamaño de la muestra fue N=4. Panel superior se muestran las autorradiografías procedentes de la inmunodetección de GRK 2. Panel inferior: Análisis densitométrico de dichas autorradiografías. A la densidad óptica del control se le asignó un valor arbitrario de 100. La densidad óptica de los grupos experimentales se representa en porcentaje respecto al control. Los datos representan la media \pm ESM. Comparación estadística frente al control: * $p < 0.05$.

Los resultados muestran que en las ratas con encefalomiелitis los niveles tanto de GRK 2 como de β -arrestina tienden a aumentar en membrana de hipocampo aunque este aumento no es significativo. Los tratamientos con inhibidores de PKC mantienen los niveles de ambas proteínas entorno a los valores control, salvo en ratas controles tratadas con queleritrina en las que aparece una disminución significativa.

Citosol

Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre GRK 2 y β -arrestina:

Con el fin de completar la valoración de la modulación del sst analizamos los niveles de GRK 2 y de β -arrestina para ver si había traslocación a membrana.

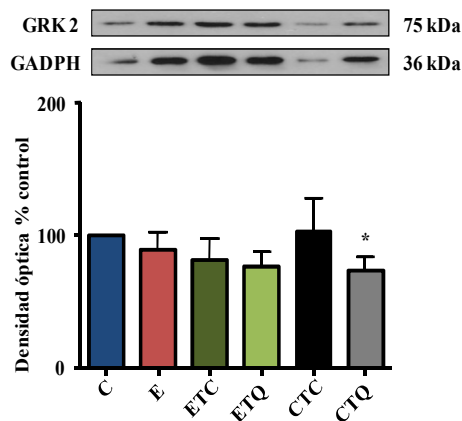


Figura 5: Efecto de ciclosporina y de la queleritrina sobre las isoforma 2 de la proteína quinasa asociada al receptor de somatostatina GRK 2 en citosol de hipocampo. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados N=5. Panel superior se muestran las autorradiografías procedentes de la inmunodetección de GRK 2. Panel inferior: Análisis densitométrico de dichas autorradiografías. A la densidad óptica del control se le asignó un valor arbitrario de 100. La densidad óptica de los grupos experimentales se representa en porcentaje respecto al control. Los datos se representan la media \pm ESM. Comparación estadística frente al control: * $p < 0.05$.

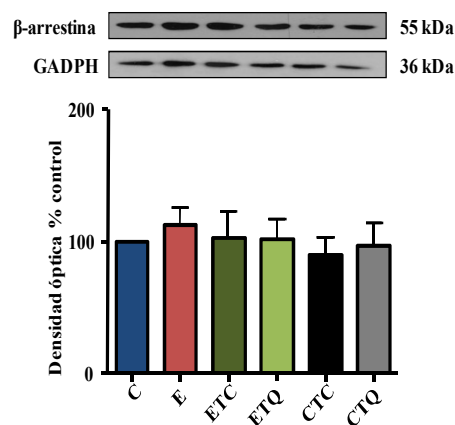


Figura 6: Efecto de ciclosporina y de la queleritrina sobre las β -arrestina en citosol de hipocampo. C corresponde a las ratas control, E ratas con EAE-CR, ETC ratas con EAE-CR tratadas con ciclosporina, (inhibidor de PKC α) ETQ ratas con EAE-CR tratadas con queleritrina (inhibidor de PKC θ), CTC y CTQ son los correspondientes controles tratados N=5. Panel superior se muestran las autorradiografías procedentes de la inmunodetección de GRK 2. Panel inferior: Análisis densitométrico de dichas autorradiografías. A la densidad óptica del control se le asignó un valor arbitrario de 100. La densidad óptica de los grupos experimentales se representa en porcentaje respecto al control. Los datos se representan la media \pm ESM. Comparación estadística frente al control: * $p < 0.05$.

Los resultados muestran que los niveles de GRK2 en citosol de las ratas control tratadas con queleritrina, se encuentran disminuidas en comparación con las ratas control. Estos valores se correlacionan con los niveles de GRK2 en membrana, indicando una posible translocación de GRK2 a membrana.

Discusión de resultados:

La inmunización de ratas Lewis con una emulsión de MEC ha demostrado en numerosos estudios activar una respuesta inflamatoria que conduce a la producción de anticuerpos contra la mielina que, posiblemente, están implicados en el desarrollo de la enfermedad. Recientemente, se ha observado que la presencia de anticuerpos IgG contra la mielina se correlaciona con el desarrollo de los síntomas clínicos de la EAE. Por otro lado, se sugiere que las células B y los anticuerpos que generan son fundamentales para la patogénesis de la EAE. Además, los pacientes de EM presentan elevadas concentraciones en suero de anticuerpos IgG con actividad proteolítica reactivos contra mielina en comparación con la población control. Las células del sistema inmunológico tras activarse y atravesar la barrera hematoencefálica acceden al CNS donde producen la activación de la microglía. Ésta, genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno que va a producir daño directo sobre neuronas y oligodendrocitos. Entre los radicales libres destaca en anión superóxido, que es altamente reactivo, el cual produce un daño directo en lípidos de membrana.

Los resultados presentados indican que en el hipocampo de ratas con EAE-CR hay un aumento de los niveles de peroxidación lipídica. Los estudios de Tapper y colaboradores han mostrado que ésta alteración de la membrana celular, produce cambios en su fluidez y permeabilidad que pueden alterar la funcionalidad de los receptores de membrana. Estudios de Aguado-Llera y colaboradores han mostrado una disminución de la funcionalidad de los receptores de somatostatina en un modelo agudo de la EM. Nuestros estudios sobre los niveles proteicos de sstr muestran una disminución en la cantidad del sstr3 que pueden ayudar a explicar los resultados obtenidos previamente. El mecanismo por el cual este receptor está disminuido en la EAE-CR puede ser mediado por el sistema de internalización GRK- β -arrestina.

Los inhibidores de PKC y más concretamente el inhibidor de PKC- θ , queleritrina se encuentra únicamente en linfocitos T, además, se ha descrito que ratones genéticamente deficientes en PKC θ , son resistentes a la inducción de EAE-CR. En nuestros resultados se observa una disminución de los niveles de peroxidación lipídica en ratas tratadas con los inhibidores de PKC y más concretamente en los grupos tratados con queleritrina. Estos resultados pueden ser debidos a una disminución en la infiltración linfocitaria. También se observa una recuperación en los niveles de receptores de somatostatina utilizado como parámetro guía de integridad neuronal.

Por lo tanto, a la vista de los presentes resultados, podemos sugerir que los inhibidores de PKC y más concretamente la queleritrina, podría tener un efecto terapéutico en el desarrollo de la EAE-CR, modulando el sistema inmune y reestableciendo la funcionalidad del sistema receptor-efector de la SST.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todo el equipo de investigación de neurobioquímica lo mucho que he aprendido de ellos. A Eduardo su buena disposición a la hora de orientarme en el entendimiento de la esclerosis múltiple, muchas gracias por facilitarme tanto la búsqueda de bibliografía e información acerca de esta enfermedad de la que aún se sabe tan poco. A Lilian por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado y por explicarme de una forma tan didáctica todas las dudas que le he planteado. A Arancha por estar siempre conmigo, por darme ánimos, por enseñarme todo el funcionamiento del laboratorio, las técnicas, las múltiples dudas acerca de la enfermedad que estudiamos. Por compartir conmigo tanto los momentos buenos como los malos y aportarle alegría y viveza al laboratorio, incluso en los peores momentos conseguías sacarme una sonrisa. También quiero agradecerles a mis compañeros de otros laboratorios, Cecilia, Borja, Patricia y David, lo mucho que me han orientado cuando me he encontrado perdida y los buenos consejos que me han dado para seguir adelante con ganas e ilusión.

Referencias

1. Lafaille, J. J., F. V. Keere, et al. (1997). "Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease." *J Exp Med* 186(2): 307-312.
2. Kasper, L. H. and J. Shoemaker (2010). "Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system." *Neurology* 74 Suppl 1: S2-8.
3. Melzer, N., S. G. Meuth, et al. (2008). "A beta-lactam antibiotic dampens excitotoxic inflammatory CNS damage in a mouse model of multiple sclerosis." *PLoS One* 3(9): e3149.

4. Zozulya, A. L. and H. Wiendl (2008). "The role of CD8 suppressors versus destructors in autoimmune central nervous system inflammation." Hum Immunol 69(11): 797-804
5. Kulms, D. and T. Schwarz (2002). "Mechanisms of UV-induced signal transduction." J Dermatol 29(4): 189-196.
6. Filiaci, F., G. Zambetti, et al. (1999). "Non-specific hyperreactivity before and after nasal specific immunotherapy." Allergol Immunopathol (Madr) 27(1): 24-28.
7. Gilgun-Sherki, Y., E. Melamed, et al. (2004). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy." J Neurol 251(3): 261-268.
8. Izquierdo-Claros, R. M., C. Boyano-Adanez Md Mdel, et al. (2004). "Acutely administered melatonin decreases somatostatin-binding sites and the inhibitory effect of somatostatin on adenylyl cyclase activity in the rat hippocampus." J Pineal Res 36(2): 87-94.
9. Frick, G. P., J. L. Leonard, et al. (1990). "Effect of hypophysectomy on growth hormone receptor gene expression in rat tissues." Endocrinology 126(6): 3076-3082.
10. Giulian, D., R. L. Allen, et al. (1986). "Brain peptides and glial growth. I. Glia-promoting factors as regulators of gliogenesis in the developing and injured central nervous system." J Cell Biol 102(3): 803-811
11. Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, et al. (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." Annu Rev Neurosci 27: 107-144.
12. Erdtmann-Vourliotis, M., P. Mayer, et al. (2001). "Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain." Brain Res Mol Brain Res 95(1-2): 129-137.
13. Bauer, B., N. Krumbock, et al. (2000). "T cell expressed PKCtheta demonstrates cell-type selective function." Eur J Immunol 30(12): 3645-3654.
14. Baier, G., D. Telford, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells." J Biol Chem 268(7): 4997-5004.
15. Isakov, N. and A. Altman (2002). "Protein kinase C(theta) in T cell activation." Annu Rev Immunol 20: 761-794.
16. Coudronniere, N., M. Villalba, et al. (2000). "NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3394-3399.
17. Salek-Ardakani, S., T. So, et al. (2005). "Protein kinase Ctheta controls Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol 175(11): 7635-7641